

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 横西 哲広

横浜市立大学大学院医学研究科
泌尿器科学専攻

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学教授	谷口 英樹 教授
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 分子生物学教授	大野 茂男 教授
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 組織学教授	大保 和之 教授

In vitro reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation

新生仔マウス精巣細胞の試験管内再構成

胎仔期や新生仔期の精巣細胞は、酵素処理により分離しても、精巣内や腎被膜下において精巣組織の構造を再構築することが知られている。しかし、これらは全て生体内での組織再構築であり、このような精巣組織の再構築を *in vitro* で行ったという報告はない。そこで、申請者らは古典的な気層液層境界部培養法を改良し、マウス精巣組織の器官培養法の開発を試みた。

その結果、精細管様構造が約 2 週間かけて形成されることが肉眼的に観察された。組織学的所見では、培養 2 日目には無構造であったが、培養 5 日目には索状構造を、培養 14 日目には管状構造を認めた。これらの再構成した精巣の構成細胞を確認するために、培養した再構成組織を凍結切片にして免疫染色したところ、管状構造を形成する細胞は Sox9 陽性を示しセルトリ細胞であることが確認された。生殖細胞マーカーである Tra98 陽性の精原細胞や 3β -HSD 陽性のライディッヒ様細胞の存在も確認できた。Acrosin-GFP トランスジェニックマウスの精巣細胞を用いた実験では、40 組織のうち 38 組織 (95%) で精細管構造を確認できた。さらに 19 組織 (48%) で GFP の発現を認め、精子形成は減数分裂中期まで進んでいることが示された。組織学的にも再構成精細管内の基底膜から離れた個所に精母細胞が認められ、減数分裂後半の精母細胞も確認され、アクロソームキャップを有する円形精子細胞が再構成精細管内に確認できた。これらの結果から、*in vitro* において精細管の再構成に成功し、内在性の精原細胞は半数体まで分化することが示された。

次に、この *in vitro* 精細管再構成に外部からの細胞を導入する実験を行った。浮遊した野生型マウスの精巣細胞に、pCXN-GFP トランスジェニックマウスから樹立した GS 細胞を混和して精細管を再構成させたところ、再構成組織 21 個のうち 12 個 (57%) において GS 細胞の導入が認められた。また Acrosin-GFP トランスジェニックマウスから樹立した GS 細胞を野生型マウス精巣細胞と混和して実験すると、19 組織中 7 組織 (37%) において、GS 細胞由来の Acrosin-GFP の発現を再構成精細管に認めた。GS 細胞は、再構成精細管に取り込まれ、少なくとも減数分裂期中期まで分化することが分かった。

今回の結果は、従来の *in vivo* での精細管再構築が *in vitro* においても誘導で

きることを示し、その再構成過程の継時的観察を可能とした画期的な成果である。今後、精巣の発生やその後の精子形成の研究への応用が期待でき、さらには新しい GS 細胞の *in vitro* 精子産生法への発展も期待できると考える。

学位審査は谷口英樹教授（主査）と大保和之教授（副査）による審査会と、それとは別に大野茂男教授（副査）による審査の 2 回に分けて行われた。

各審査において、以下の質疑応答が行われた。

副査の大野教授より以下の質問がなされた。

- 1) GS 細胞の定着効率を向上させるような工夫は行ったか。
- 2) 本研究の最終的な目的は何か。
- 3) ヒトにおいて円形精子細胞を用いた顕微授精は可能か。
- 4) 過去の報告で、*in vitro* で作成した凝集塊を宿主に移植した報告はあるか。

これらの質問に対して申請者が以下のように回答した。

- 1) 細胞浮遊液から凝集塊を作成する培養 2 日間に精原細胞の増殖必須因子である GDNF を培地に添加している。GDNF を加えることで精原細胞の消失数を減らし、再構成精細管に定着する精原細胞数を増やす工夫をした。
- 2) 近年、マウスの iPS 細胞から始原生殖細胞様の細胞 (PGC-like cells: PGCLC) の *in vitro* 分化誘導の成功が報告された。オスの PGCLC を新生仔マウスの精細管に移植すると妊孕能を有する精子に分化した。この成果は男性不妊の治療へ応用できると期待された。しかし、iPS 細胞から PGCLC を誘導させても、精子を得るためには侵襲を要する移植処置が必要であることが問題である。そこで iPS 細胞から精巣細胞を分化誘導し、それらと PGCLC を混和させ *in vivo* で精細管再構成できれば、安全な精子分化誘導法になると期待している。本研究はそのファーストステップとして、まずは新生仔マウス精巣細胞から *in vitro* において精細管の再構成を試みた。
- 3) 技術的には可能であり報告もされている。しかし出生率が低いため安全性と確実性から円形精子細胞の顕微授精の臨床応用は一般的には行われていない。
- 4) 精巣細胞をマトリゲル上で培養して出来た凝集塊を、去勢した宿主マウスの背部皮下に移植した先行研究がある。移植後の再構成精細管の基底膜上に精原細胞の生存は認めるものの精子形成は行われていなかったと報告している。現在まで *in vitro* で精子形成機能を支持する精細管を再構成した報告はない。

副査の大保教授より以下の質問がなされた。

- 1) 成熟マウスを用いた場合では、精細管は再構成出来るのか。

- 2) *Acrosin*-GFP トランスジェニックマウスの発現が凝集するメカニズムは。
- 3) GS細胞を混和して再構成精細管を作成した実験で精原細胞のマーカーを確認しているか。

これらの質問に対して申請者が以下のように回答した。

- 1) 12 日齢の *Acrosin*-GFP トランスジェニックマウスを用いた実験では、精細管が再構成され、再構成精細管内に GFP の発現を確認できた。しかし 4 週齢以上では肉眼的に再構成された精細管を認めることが出来なかった。新生仔マウスを用いた方が精細管の再構成と精子形成効率も良好であった。
- 2) *acrosin* プロモーターの下流に *proacrosin* シグナルペプチド、*proacrosin* の N 末端ペプチドと EGFP が挿入されているため、先体に GFP 発現が凝集する仕組みになっている。
- 3) 現在のところ、幹細胞マーカーの染色は行っていない。精原細胞や GS 細胞の再構成精細管への定着効率を高める工夫が必要である。今後は、それらの定着を定量的に検討評価するため、実験に加えてゆく必要があると考えられる。

主査の谷口教授より以下の質問がなされた

- 1) *in vivo* と *in vitro* で作成した再構成精巣組織において時系列な違いを評価すれば改良点を検出できるのではないか。
- 2) 培養を継続するとその後に精子形成が進行する可能性はあるか。
- 3) テストステロンなどの精子形成に必須なファクターを加えるなどの工夫はしたか。

これらの質問に対して申請者が以下のように回答した。

- 1) *in vitro* と *in vivo* で作成した再構成組織の体細胞のマイクロアレイ分析を計画する。これによって発現が低下している転写因子などを同定し、精巣の発生や精子形成に関わるシグナルやファクターの培地への添加を検討する。これによってより精子形成効率の高い再構成精細管組織が作成できる可能性が高いと考える。
- 2) これまでの実験では、再構成精細管組織は 6 週から 8 週に精子形成のピークが起こる。その後は比較的急速に組織変性が進み、初期を超えるほどの精子形成を認めることはない。これらのことから再構成精細管での精子形成は 1 wave であると想定される。
- 3) 上流シグナルである下垂体ホルモンやテストステロンを培地に加えたが、精子形成効率や分化効率に著効は認められなかった。今後はマイクロアレイ分析を用いて再構成精細管の精子形成に重要なファクターの検索を行ってゆきたいと考える。

上記内容の学位審査により、申請者は学位（博士）授与に相当することが適切であることが認められた。

